

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580174

研究課題名(和文)新規慢性炎症関連因子「アンジオポエチン様因子2」を標的とした慢性炎症予防

研究課題名(英文)Prevention of chronic inflammation targeting angiopoietin-like protein 2

研究代表者

西山 和夫(Nishiyama, Kazuo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：40164610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：近年、種々の疾病の発症因子として慢性炎症が注目されており、新規慢性炎症関連因子としてアンジオポエチン様因子2が報告された。食品成分による慢性炎症予防の可能性を明らかにするためにアンジオポエチン様因子2の受容体である $\alpha 1$ インテグリンのヒト膀胱ガン細胞における発現とマウス脂肪細胞におけるアンジオポエチン様因子2の発現に対する $\alpha$ -リポ酸の影響について検討した。その結果、 $\alpha$ -リポ酸は $\alpha 1$ インテグリンとアンジオポエチン様因子2自体の発現を抑制することが明らかとなり、 $\alpha$ -リポ酸によってアンジオポエチン様因子2を介した慢性炎症および慢性炎症に起因する疾病が予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently chronic inflammation is regarded as causes of various diseases, such as diabetes, atherosclerosis and cancer. Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2), a novel pro-inflammatory adipokine, has been reported to have important roles in the chronic inflammation and pathogenesis of various diseases. ANGPTL2 induces inflammatory signals via its receptor, integrin. In this study, we investigated the effect of alpha-lipoic acid (LA) on the expression of beta1-integrin in a human bladder cancer cell line and ANGPTL2 expression in 3T3-L1 murine adipocyte cell line. LA inhibited both beta1-integrin and ANGPTL2 expressions in a dose dependent manner, suggesting that LA might reduce chronic inflammation by inhibiting ANGPTL2 signaling pathway.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：慢性炎症 アンジオポエチン様因子2  $\alpha 1$ インテグリン  $\alpha$ -リポ酸

## 1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、糖尿病、肝疾患、動脈硬化性疾患、ガンなどの病気に共通する発症因子として「慢性炎症」が注目されている。慢性炎症は感染、外傷などによって比較的短期間に炎症反応の活性化と沈静化が起こる急性炎症と異なり、長期間にわたり低レベルの炎症反応が継続している状態である。申請者は、ガン細胞の転移に深く関与している細胞接着因子であるインテグリンに関する研究を行ってきたが、ガン以外の疾病へのインテグリンの関与について情報検索を行った結果、インテグリンを受容体とする分泌性タンパク質であるアンジオポエチン様因子2が肥満と脂肪組織の炎症および全身性インスリン抵抗性を結びキメディエーターであることが報告されていた。アンジオポエチン様因子ファミリーは血管新生因子であるアンジオポエチンと構造が類似した分泌性タンパク質であり、ヒトで7種類同定されている。これらの中でアンジオポエチン様因子2は、脂肪細胞の分化が進むにつれて産生量が増加すること、ボディマスインデックス(BMI)や炎症の指標となるC-反応性タンパク質(CRP)と正の相関を示し、糖尿病患者では健常者より血中濃度が高くなっていることなどが報告されている。以上のことから、食品成分によるアンジオポエチン様因子2のシグナリングや発現制御が慢性炎症の予防に有効である可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

- (1) アンジオポエチン様因子2の受容体として $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが同定されているが、ガン細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど種々の細胞が $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを発現している。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介したシグナリングにより種々の炎症性サイトカインの産生が促進される。したがってアンジオポエチン様因子2の標的となる細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現を食品成分で制御することができれば、アンジオポエチン様因子2による慢性炎症の抑制につながることを期待できる。そこで、食品成分として $\alpha$ -リポ酸を用い、ヒト膀胱ガン細胞における $\beta 1$ インテグリンの発現に対する影響を検討した。
- (2)  $\alpha$ -リポ酸が膀胱ガン細胞の細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現を抑制することが明らかとなったので、次に $\alpha$ -リポ酸と類似した構造をもつ化合物を用いて $\beta 1$ -インテグリンの発現抑制活性に必要な $\alpha$ -リポ酸の構造について検討した。
- (3) 脂肪細胞におけるアンジオポエチン様因子2の発現に対する $\alpha$ -リポ酸の影響を検討した。

## 3. 研究の方法

- (1)  $\alpha$ -リポ酸がヒト膀胱ガン細胞株T24の細胞全体および細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現量に及ぼす影響についてフローサイトメトリーを用いて調べた。
- (2) ヒト膀胱ガン細胞株T-24を $\alpha$ -リポ酸、カプ

リル酸、ジヒドロリポ酸で処理し、フローサイトメトリーを用いて細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現量を測定した。

- (3) マウス脂肪前駆細胞3T3-L1を脂肪細胞に分化・成熟させ、ウェスタンブロット法を用いてアンジオポエチン様因子2の産生に対する $\alpha$ -リポ酸の影響を調べた。

## 4. 研究成果

- (1)  $\alpha$ -リポ酸はT24細胞の細胞全体における $\beta 1$ -インテグリンの発現量には影響を及ぼさず、細胞内膜輸送を調節して細胞質内に $\beta 1$ -インテグリンを蓄積させることで細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現量を選択的に低下させることが示された。さらに $\alpha$ -リポ酸は $\beta 1$ -インテグリンの発現量を低下させることで、型コラーゲンおよびフィブロネクチンに対する接着能を低下させ、細胞のインテグリン-細胞外マトリクス相互作用を阻害した。それによりインテグリン裏打ちタンパク質のリン酸化が抑制され、その下流のシグナル伝達経路に存在し、遺伝子発現や細胞骨格運動を調節して細胞の遊走、浸潤亢進に関与するタンパク質の活性化が負に制御された。これらの結果から $\alpha$ -リポ酸はT24細胞の細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現量を減少させることによって慢性炎症へとつながるインテグリンシグナルを抑制することが示唆された。

- (2) T-24細胞の細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現量に対する $\alpha$ -リポ酸、カプリル酸、ジヒドロリポ酸の影響を調べた結果、 $\alpha$ -リポ酸は濃度依存的に細胞表面における $\beta 1$ -インテグリンの発現量を減少させたが、 $\alpha$ -リポ酸の構造類自体であるカプリル酸とジヒドロリポ酸にはその作用は認められなかった。また、 $\alpha$ -リポ酸はフィブロネクチンとコラーゲンに対するT-24細胞の接着能を低下させ、細胞の遊走能・浸潤能を抑制した。しかし、カプリル酸とジヒドロリポ酸ではこのような影響はみられなかった。これらの結果より、 $\alpha$ -リポ酸の環状ジスルフィド構造がT-24細胞の細胞表面における $\beta 1$ -インテグリン発現の抑制に重要であることが示唆された。

- (3)  $\alpha$ -リポ酸は分化・成熟させた3T3-L1細胞におけるアンジオポエチン様因子2の産生を濃度依存的に抑制することが明らかになった。

以上のように $\alpha$ -リポ酸は、アンジオポエチン様因子2の受容体である $\beta 1$ -インテグリン発現とアンジオポエチン様因子2自体の発現を低下させることによってアンジオポエチン様因子2-インテグリンシグナル伝達系を抑制することが明らかとなり、 $\alpha$ -リポ酸によって慢性炎症および慢性炎症に起因する疾病が予防できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

Masao Yamasaki, Shozen Soda, Masahiro Iwase, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Kazuo Nishiyama. The importance of 1,2-dithiolane structure in alpha-lipoic acid for the downregulation of cell surface  $\beta$ 1-integrin expression of human bladder cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 査読有、in press  
Hashiguchi T, Sakakibara Y, Shimohira T, Kurogi K, Yamasaki M, Nishiyama K, Akashi R, Liu MC, Suiko M. Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biochem.* 155(2), 91-97, 2014. (査読有)

DOI: 10.1093/jb/mvt102

Yo-ichi Ishida, Masao Yamasaki, Chizuko Yukizaki, Kazuo Nishiyama, Hirohito Tsubouchi, Akihiko Okayama, Hiroaki Kataoka. Carnosol, rosemary ingredient, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via glutathione depletion; proteomic approach using fluorescent two-dimensional differential gel electrophoresis. *Human Cell*, 27(2), 68-77, 2014. (査読有)

DOI: 10.1007/s13577-013-0083-6

Masao Yamasaki, Masahiro Iwase, Kazuo Kawano, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Masahiro Ikeda, Kazuo Nishiyama. Alpha Lipoic Acid suppresses migration and invasion via downregulation of cell surface  $\beta$ 1-integrin expression in bladder cancer cells. *J Clin Biochem Nutr.* 54(1), 18-25, 2014. (査読有)

DOI: 10.3164/jcfn.13-57

Masao Yamasaki, Chihiro Motonaga, Marino Yokoyama, Aya Ikezaki, Tomoka Kakihara, Rintaro Hayasegawa, Kaede Yamasaki, Masanobu Sakono, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Kazuo Nishiyama. Induction of apoptotic cell death in HL-60 cells by jacaranda seed oil. *Journal of Oleo Science*, 62(11), 925-932, 2013. (査読有)

DOI: 10.5650/jos.62.925

Masao Yamasaki, Yoshihiro Mine, Misato Nishimura, Satoshi Fujita, Yoichi Sakakibara, Masahito Suiko, Kazuhiro Morishita and Kazuo Nishiyama. Genistein induces apoptotic cell death associated with inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in adult T-cell leukemia cells. *Cell*

*Biology International*, 37(7), 742-747, 2013. (査読有)

DOI: 10.1002/cbin.10101

Ryo Kijima, Taro Honma, Junya Ito, Masao Yamasaki, Aya Ikezaki, Chihiro Motonaga, Kazuo Nishiyama, and Tsuyoshi Tsuduki. Jacaric acid is rapidly metabolized to conjugated linoleic acid in rats *Journal of Oleo Science*, 62(5), 305-312, 2013. (査読有)

DOI: 10.5650/jos.62.305

Hirotohi Tsuda, Hisato Kunitake, Ryoko Kawasaki-Takaki, Kazuo Nishiyama, Masao Yamasaki, Haruki Komatsu and Chizuko Yukizaki

Antioxidant Activities and Anti-Cancer Cell Proliferation Properties of Natsuhaze (*Vaccinium oldhamii* Miq.), Shashanbo (*V. bracteatum* Thunb.) and Blueberry Cultivars. *Plants*, 2(1), 57-71, 2013. (査読有)

DOI: 10.3390/plants2010057

Yamasaki M, Nagatomo T, Matsuyama T, Ikeho Y, Kato E, Nishiyama K, Sakakibara Y, Suiko M, Nishiyama K. Conjugated Linoleic Acids Inhibit Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Stabilization under Hypoxic Condition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Oleo Science*, 61(9), 491-496, 2012. (査読有)

DOI: 10.5650/jos.61.491

Shinohara N, Ito J, Tsuduki T, Honma T, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Yamasaki M, Ikezaki A, Yokoyama M, Nishiyama K, Nakagawa K, Miyazawa T, and Ikeda I. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, reduces stearyl-CoA desaturase expression in liver of mice *Journal of Oleo Science*, 61(8), 433-441, 2012. (査読有)

DOI: 10.5650/jos.61.433

Yamasaki M, Iwase M, Kawano K, Sakakibara Y, Suiko M, Nishiyama K. Selective Inhibition by Apocynin of the Proliferation and Adhesion to Fibronectin of v-H-ras-transformed 3Y1 Cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76(6), 1177-1181, 2012. (査読有)

DOI: 10.1271/bbb.120061

Shinohara N, Tsuduki T, Ito J, Honma T, Kijima R, Sugawara S, Arai T, Yamasaki M, Ikezaki A, Yokoyama M, Nishiyama K,

Nakagawa K, Miyazawa T, Ikeda I. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 1821(7), 980-988, 2012. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbali.2012.04.001

Yasuda, S., Kuwata, H., Kawamoto, K., Shirakawa, J., Atobe, S., Hoshi, Y., Yamasaki M., Nishiyama, K., Tachibana, H., Yamada, K., Kobayashi, H., Igoshi, K. Effect of Highly Lipolyzed Goat Cheese on HL-60 Human Leukemia Cells: Antiproliferative Activity and Induction of Apoptotic DNA Damage. *J Dairy Sci.* 95(5), 2248-2260, 2012. (査読有)

DOI: 10.3168/jds

Yamasaki M., Iwase M, Kawano K, Sakakibara Y., Suiko M, Nishiyama K. Alpha lipoic acid selectively inhibits proliferation and adhesion to fibronectin of v-H-ras-transformed 3Y1 cells. *J Clin Biochem Nutr.* 50(3), 234-240, 2012. (査読有)

DOI: 10.3164/jcbrn

Nagahama K, Eto N, Yamamori K, Nishiyama K., Sakakibara Y, Iwata T, Uchida A, Yoshihara I, Suiko M. Efficient Approach for Simultaneous Estimation of the Multiple Health-Promoting Effects of Foods. *J Agric Food Chem.* 59(16), 8575-8588, 2011. (査読有)

DOI: 10.1021/jf201836g

Hashiguchi T, Kurogi K, Sakakibara Y., Yamasaki M., Nishiyama K., Yasuda S, Liu MC, Suiko M. Enzymatic Sulfation of Tocopherols and Tocopherol Metabolites by Human Cytosolic Sulfotransferases. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75(10), 1951-1956, 2011. (査読有)

DOI: 10.1271/bbb.110352

[学会発表](計 15 件)

中村崇弘、山崎正夫、西山和夫、脂肪組織を標的とした $\gamma$ -リノレン酸の抗炎症作用、平成25年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2013年10月19日、福岡

松山勇介、甲斐孝憲、亀長浩蔵、松浦靖、柚木崎千鶴子、西山和夫、山崎正夫、ブルーベリー葉抽出物が脂肪細胞の機能に及ぼす影響、平成25年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2013年10月19日、福岡

今村健太、浅井桃子、菅本和寛、松本朋子、山崎有美、亀井一郎、服部貴博、岸本正興、新坂誠司、西山和夫、山崎正夫、CordycepinによるLPS誘導性NO産生抑制効果、第481回日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会、2013年9月6日、広島

早田昌然、岩瀬将弘、榊原陽一、水光正仁、山崎正夫、西山和夫、細胞接着分子integrinを標的とした $\alpha$ -リポ酸のガン細胞の浸潤・転移抑制、2013年度生物機能研究会、2013年7月20日、熊本

久米田翔子、山崎正夫、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸によるアンジオポエチン様タンパク質2の産生抑制作用、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月25日、仙台

松山勇介、甲斐孝憲、亀長浩蔵、竹下正彦、菊池幸治、松浦靖、柚木崎千鶴子、西山和夫、山崎正夫、ブルーベリー葉抽出物が脂肪細胞の機能に及ぼす影響、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月25日、仙台

岩瀬将弘、河野和生、山崎正夫、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸の $\beta$ 1-integrinを標的とした膀胱ガン細胞の浸潤・転移抑制作用、第7回 $\alpha$ リポ酸研究会、2012年10月19日、京都

今村健太、浅井桃子、菅本和寛、松本朋子、山崎有美、亀井一郎、服部貴博、岸本正興、新坂誠司、西山和夫、山崎正夫、冬虫夏草(Cordyceps militaris)の抗炎症作用、平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2012年9月29日、鹿児島

中村崇弘、山崎正夫、西山和夫、アラキドン酸、 $\gamma$ -リノレン酸による抗炎症作用と作用機序に関する研究、平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2012年9月29日、鹿児島

岩瀬将弘、河野和生、山崎正夫、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸の細胞接着因子integrinを標的とした膀胱ガン転移抑制機構、平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、2012年9月29日、鹿児島

中村崇弘、山崎正夫、西山和夫、脂肪酸による一酸化窒素及びMCP-1産生抑制作用、第66回日本栄養・食糧学会大会、2012年5月19日、仙台

中村崇弘、梁井綾香、平原秀秋、中原徳昭、山崎正夫、西山和夫、フードサイエンスフォーラム第20回記念学術集会、ブルーベリー葉抽出物による脂肪細胞の機能制御と炎症予防、2011年9月17日、宮崎

中村崇弘、梁井綾香、平原秀秋、中原徳昭、山崎正夫、西山和夫、ブルーベリー葉抽出物による脂肪細胞の機能制御と炎症予防、平成23年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会、2011年9月4日、佐賀

岩瀬将弘、河野和生、山崎正夫、水光正仁、榊原陽一、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸による

v-Ha-ras 形質転換細胞の  $\beta$ 1-integrin の発現抑制、2011 年度生物機能研究会、2011 年 7 月 2 日、福岡

久米田翔子、有菌裕規、西本健太郎、北岡翔太、川邊暁子、山崎正夫、榊原陽一、水光正仁、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸のアポトーシス誘導機構解明、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、東京

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西山 和夫 ( NISHIYAMA, Kazuo )

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：40164610

### (3)連携研究者

山崎 正夫 ( YAMASAKI, Masao )

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80381060

榊原 陽一 ( SAKAKIBARA, Yoichi )

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90295197